

*Вахрушева В.Ч.¹, Маклакова И.Ю.^{1,2},
Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Базарный В.В.¹, Гаврилов И.В.^{1,2}*

ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЕЕ РЕЗЕКЦИИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский
университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация
²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Цель исследования — изучить влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на регенерацию печени в физиологических условиях и после ее резекции в условиях старения организма.

Материалы и методы. Выделение культуры ММСК осуществлялось из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 22–23 г, срок гестации 18 дней. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO₂ – инкубатора при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа в дозе 4 млн. клеток/кг. Введение ММСК осуществлялось в физиологических условиях (без резекции печени) и через 1 час после субтотальной резекции печени зрелым и старым лабораторным животным. Производилась оценка биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК.

Результаты. Трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным без резекции печени не приводит к изменениям биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени. На 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК у зрелых лабораторных животных обнаружено снижение уровня АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы по сравнению с контрольной подгруппой зрелых животных. У старых животных этот эффект появляется на 7 сутки. У зрелых и старых животных обнаружено повышение площади ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ), количества двуядерных клеток. У зрелых лабораторных животных выявлено снижение уровня апоптоза, повышение митотической активности, что привело к увеличению количества гепатоцитов. В то же время у старых животных отмечено уменьшение апоптози-

ческого индекса, уровень митозов, количество гепатоцитов не отличалось от данных контрольной подгруппы.

Заключение. Установлено, что трансплантация ММСК зрелым и старым лабораторным животным после субтотальной резекции печени стимулирует ее регенерацию. У зрелых животных выявлена активация клеточной регенерации (увеличение количества гепатоцитов) и внутриклеточной (повышение количества двуядерных клеток, ЯЦИ), тогда как у старых — лишь за счет активации внутриклеточной регенерации.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, регенерация печени, биохимические показатели, морфометрические показатели

Известно, что печень в физиологических условиях обладает низкой скоростью клеточного обновления [1]. Наличие нескольких способов регенерации печени (клеточный и внутриклеточный), а также их низкий уровень интенсивности определяет сложности, возникающие при оценке физиологической регенерации. В старом организме скорость протекания клеточной и внутриклеточной регенерации снижается по сравнению со зрелым организмом [2, 3, 4]. В то же время известно, что регенерация печени существенно активируется после ее резекции. В настоящем исследовании изучение регенераторных процессов в печени зрелых и старых животных осуществлялось в условиях ее резекции. В качестве дополнительного фактора, активирующего регенерацию печени, была использована аллогенная трансплантация плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Выбор этих клеток был обусловлен их способностью к выработке противовоспалительных факторов, факторов роста (HGF — Hepatocyte growth factor, VEGF — Vascular endothelial growth factor), матриксных металлопротеиназ [5, 6, 7, 8, 9]. Иммуносупрессивные свойства ММСК определили возможность проведения аллогенной трансплантации данных видов клеток [10].

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 84 белых зрелых лабораторных мышьях-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 20-23 г. и 84 старых лабораторных мышьях-самцах возраста 16-17 месяцев, массой 27-30 г. Производилось выделение культуры ММСК из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышьях-самок возраста 3-4 месяца, срок гестации 18 дней. Все эксперименты, уход и содержание осуществлялись в соответствии с Директивой №63 от 22 сентября 2010 года Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Вы-

полнение исследований одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» протокол № 8 от 20.10.2017.

Культивирование ММСК проводилось в условиях CO_2 — инкубатора (Termo Scientific, США) при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа. Идентификация ММСК проводилась иммуноцитохимическим методом с использованием набора Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin $\beta 1$, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Изучение функциональных свойств выделенных клеток было проведено путем направленной дифференцировки полученной культуры в направлениях, характерных для ММСК — в адипоцитарном и остеогенном. Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего и перед трансплантацией составила 95-97%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа в дозе 4 млн. клеток/кг.

Резекция 2/3 печени у лабораторных мышей выполнена по методике С. Mitchell и Н. Willenbring [11]. Введение клеток производили в хвостовую вену через 1 час после выполнения резекции. Исследовалось влияние ММСК на морфометрические показатели печени и биохимические показатели периферической крови в физиологических условиях и после субтотальной резекции на 1, 3, 7 сутки. Из опыта животных выводили декапитацией под легким эфирным наркозом.

Были выделены опытная и контрольная подгруппы лабораторных животных. Опытной подгруппе животных проводили трансплантацию ММСК в дозе 4 млн клеток/кг. контрольной подгруппе вводили раствор NaCl 0,2 мл.

Подготовку образцов ткани печени для гистологического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Leica EG 1160 (Leica, Германия) с последующей заливкой в парафин. Гистологические срезы печени толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия). С этой целью производили микрофото съемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (OLYMPUS, Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе).

Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм^2 , площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита = площадь гепатоцита – площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двоядерных гепатоцитов на 1 мм^2 , митотический индекс (МИ), апопто-

тический индекс (АИ). Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) определяли, как отношение ядра и цитоплазмы клетки. Митотический, апоптотический индексы, выражали в промилле (‰). Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода AporTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подчитанных гепатоцитов.

Оценка биохимических показателей периферической крови производилась на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе Chem Well 2910 (Combi). Изучались следующие биохимические показатели: общий белок (биуретовая реакция), альбумин (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазо-салицилат-гипохлоритный метод, реакция Бергбота), глюкоза (реакция Триндера), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ). При определении биохимических показателей использовались наборы компании «Ольвекс Диагностикум», Россия.

Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Результаты исследования

При анализе биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени зрелых и старых лабораторных животных на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК лабораторным животным без резекции печени.

На 1 сутки после резекции печени также как в физиологических условиях в обеих возрастных группах отмечено отсутствие эффекта от аллогенной трансплантации плацентарных ММСК.

На 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК у зрелых лабораторных животных выявлено снижение показателей АСТ на 24,1%, АЛТ на 24,8%, щелочной фосфатазы на 23,1% по сравнению с данными контрольной подгруппы (таблица 1).

Анализируя биохимические показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК отмечено снижение уровня ферментов АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы по сравнению с данными контрольной подгруппы. Также обнаружено повышение уровня фибриногена в обеих изучаемых возрастных группах. У зрелых лабораторных животных отмечено повышение уровня мочевины на 21,9% по сравнению с данными контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных (таблица 2).

Таблица 1
Биохимические показатели периферической крови лабораторных мышей
на 3 сутки после резекции печени

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	50,03±4,82	55,61±4,24	47,76±4,48	55,34±5,09
Альбумин, г/л	19,80±2,51	21,60±3,14	18,11±2,36	18,87±2,51
Мочевина, ммоль/л	4,37±0,33	4,59±0,36	4,49±0,39	4,60±0,51
Глюкоза, ммоль/л	3,66±0,29	4,20±0,46	4,13±0,72	4,40±0,34
Общий билирубин, мкмоль/л	21,99±5,47	21,29±2,36	25,89±2,27	24,20±2,06
АСТ, Ед/л	209,53±13,85	158,99±14,38*	212,14±19,08	24,20±2,06
АЛТ, Ед/л	155,24±9,38	116,73±12,51*	211,50±18,06	203,93±19,32
Щелочная фосфатаза, Ед/л	106,67±10,45	82,0±7,26*	130,37±25,94	200,39±18,59
Фибриноген, г/л	2,0±0,17	2,11±0,18	2,27±0,26	2,49±0,24

Примечание: * отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При изучении морфометрических показателей печени на 1 и 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК не обнаружено отличий между опытной и контрольной подгруппами в обеих возрастных группах.

При анализе морфометрических показателей зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени в опытной группе отмечено увеличение количества МИ на 27,7%, снижение АИ на 24,3%, что привело к повышению количества гепатоцитов на 24,8%. В то же время у старых лабораторных животных выявлено лишь повышение АИ без увеличения МИ и общего количества гепатоцитов.

Также у зрелых и старых лабораторных животных отмечено увеличение площади ядра гепатоцитов, что привело к возрастанию ЯЦИ. У лабораторных животных обеих возрастных групп отмечено увеличение количества двоядерных гепатоцитов (таблица 3).

Таблица 2
Биохимические показатели периферической крови
лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени

Показатели	Значение			
	Зрелые		Старые	
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Общий белок, г/л	44,27±3,62	49,63±2,80	47,63±3,77	52,77±3,85
Альбумин, г/л	20,59±1,90	23,13±2,32	18,13±1,42	20,19±2,16
Мочевина, ммоль/л	4,57±0,46	5,57±0,48*	4,54±0,35	4,97±0,23
Глюкоза, ммоль/л	4,30±0,29	4,91±0,51	4,26±0,39	4,53±0,37
Общий билирубин, мкмоль/л	15,41±2,76	14,81±2,02	17,14±2,21	16,34±1,84
АСТ, Ед/л	153,86±16,96	103,57±12,42*	183,59±16,79	123,8±9,29°
АЛТ, Ед/л	137,10±16,29	86,34±7,52*	175,01±12,82	127,34±10,12°
Щелочная фосфатаза, Ед/л	83,11±5,93	64,23±6,00*	114,89±9,67	90,50±6,51°
Фибриноген, г/л	2,20±0,20	2,76±0,15*	2,44±0,16	3,03±0,20°

Примечание: * отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ° отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности ММСК в зрелом и старом организме восстанавливать морфофункциональное состояние печени после ее субтотальной резекции. Об этом свидетельствуют изменения биохимических показателей периферической крови — снижение повышенной активности ферментов (АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы). При этом у зрелых животных коррекция данных показателей на фоне трансплантации плацентарных ММСК отмечается уже на 3 сутки после резекции печени, тогда как у старых животных этот эффект выявлен на 7 сутки. Также на фоне введения ММСК после резекции печени выявлены морфометрические изменения, свидетельствующие об активации регенерации печени. Однако механизмы активации регенерации в зрелом и старом организме имеют некоторые отличия. У зрелых лабораторных животных восстановление структуры органа достигается за счет механизмов клеточной (увеличение количества гепатоцитов) и внутриклеточной регенерации (увеличение размеров ядра, ЯЦИ), в то время как у старых лабораторных животных за счет внутриклеточной регенерации.

Таблица 3
Морфометрические показатели печени лабораторных мышей на 7 сутки
после резекции печени, $M \pm m$, $n=7$

Показатели	Значение			
	NaCl	ММСК	NaCl	ММСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1918,29±82,04	2394,14±225,8*	1552,00±101,14	1591,43±102,08
Площадь гепатоцитов, мкм ²	286,41±22,44	275,14±24,16	348,19±28,36	352,31±33,73
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	63,39±5,12	76,63±4,92*	72,77±10,32	87,93±8,91°
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	223,03±17,97	204,37±22,80	227,13±15,37	224,73±19,86
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,29±0,02	0,38±0,02*	0,32±0,02	0,39±0,01°
Количество двоядерных гепатоцитов на мм ²	320,77±10,64	393,90±23,23*	305,74±22,52	379,71±35,33°
Митотический индекс, %	4,51±0,47	5,76±0,49*	1,50±0,10	1,57±0,12
Апоптотический индекс, %	1,25±0,09	0,94±0,07*	1,81±0,17	1,42±0,12°

Примечание: * отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p<0,05$; ° отличие от контрольной подгруппы старых лабораторных животных, достоверно с $p<0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michalopoulos G.K. Liver regeneration // J. Cell Physiol. – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
2. Shinichiro O., Shinichi M. Potentials of Regenerative Medicine for Liver Disease // Surg. Today. – 2009. – Vol.39. P.1019–1025.
3. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration // Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2009. – №4, Vol.20. – P. 171–176.
4. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор) / Вестник Уральской медицинской академической науки. 2007. № 1. С. 91-94.
5. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015. Т. 59. № 4. С. 82-86.
6. Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells.

Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2012; 11: 360-371 [PMID:22893462 DOI: 10.1016/S1499-3872(12)60193-3].

7. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols // Biomed Research International. 2014. P.951512.

8. Sun L., Fan X., Zhang L. et. al. Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats // International journal of molecular medicine. - 2014. - 34. - 987-96.

9. Prockop D.J., Oh J.Y Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation // Mol. Ther. – 2012. – Vol. 20(1) – P.14-20.

10. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nat Immunol 2014. Vol. 15. P. 1009 –1016.

11. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice // Nature protocols. Vol.3. №7.2008. P. 1167-1171. doi: 10.1038/nprot.2014.122.